小鼠骨髓细胞体外液体培养

THE TECHNIQUE FOR CULTURED CELLULAE MEDULLARES OF MICE *IN VITRO*

自六十年代初相继出现了体外研究血细胞的脾结节生成的实验技术、骨髓细胞体外琼脂培养等技术，大大促进了对造血干细胞的增殖和分化特性的研究，并为实验血液学提供了重要手段。但在这些培养系统中血细胞增生只能维持几天，而且多向性干细胞很快就消失了。七十年代初，国外开始发展了骨髓细胞体外液体培养法，能在体外条件下较长时间地保持造血干细胞的增殖、分化能力，为研究造血干细胞增殖、分化过程中的各种调控因素提供了一个有用的手段；这对解决临床治疗和寻找病因等问题也具有重大的实际意义。我们参照了 T. M. Dexter 等的方法，根据我们实验室现有的条件及设备在1979年初也开始建立了这种培养方法。

方 法 和 结 果

1.实验动物：6至8周令雄性昆明种小鼠。

2.液体培养系统的建立：小鼠骨髓细胞体外液体培养有两种方法。

（1）骨髓细胞与胸腺细胞的共同培养法：

在60毫升扁平培养瓶中加入8毫升含有 10^6 或 10^7 小鼠胸腺细胞的费歇氏培养液（Fiocher's medium)，其中含有20%的马血清，250μ/ml 青霉素和 50μg/ml 链霉素，pH为7.2—7.4。放在37°C或33°C培养箱中培养，24小时后每培养瓶中再加入10^7同种小鼠股骨骨髓细胞，继续在培养箱中培养，以后每周更换半量新鲜配制的培养液。

（2）骨髓细胞单独培养法：

在60毫升扁平培养瓶中加入含有20%马血清（或孕驴血清），250μ/ml 青霉素和50μg/ml链霉素的费歇氏培养液（或1640培养液），pH为7.2—7.4，然后再种入10^6至10^7小鼠股骨骨髓细胞，置于37°C或33°C培养箱中培养，每周更换半量新鲜的培养液，在三周中贴壁细胞已铺满。第四周再种入同种小鼠 10^7 骨髓细胞继续培养。每周按上述方法更换细胞培养液一次。把每周更换出的培养液离心收集细胞，涂片，染色，作形态学观察，或用收集到的细胞作其它研究。

由骨髓细胞衍生而来的贴壁细胞层，是在体外条件下造血干细胞增殖、分化的微环

本文1982年6月18日收到。
钱铭娟同志参加过部份工作。

境，贴壁细胞生长好坏是体外液体培养成败的关键，即使在已经培养得较好的培养瓶中，由于某种原因（例培养瓶壁突然受冷）贴壁细胞层脱落，培养液中的细胞生长就不能维持。促进贴壁细胞层长好的因素很复杂，我们认为其中较关键的是所用的血清及培养系统中的pH值。马血清比牛血清的成功率高（但有的马血清也不行），孕驴血清比马血清还要好。我们因条件所限，培养瓶中没有充入CO_2，只用百分之五至十的炭酸氢钠调节pH值。若在第一次种入骨髓细胞后贴壁层长不好，则在第二周再种入一次骨髓细胞，这样贴壁细胞层有可能重新长好。我们观察到贴壁细胞主要有四种细胞成份：巨噬细胞、成纤维样细胞、上皮样细胞和脂肪细胞。在显微缩时电影及相差显微镜下我们观察到贴壁细胞层中的所谓梭形细胞及园形细胞，其形态不是固定不变的，而是不时地在相互变化着，园形的细胞伸出伪足，拉长而成梭形，梭形的细胞又可以缩成园形。

在培养的悬液细胞中，红系很快就消失了（但在我们有些共同培养系统中，第四周时还有少数红系细胞）。粒细胞维持的时间较长些，在用孕驴血清单培16周的培养细胞中还有一定数量的粒系细胞，并测出有CFu-s存在。随着培养时间的延长，粒系也逐渐消失，剩下的都是巨噬细胞及单核样细胞，这些细胞可以增殖更长时间，我们有一瓶细胞一直培养了77周（后因长霉菌而终止）。

骨髓细胞体外液体培养系统调控因素十分复杂，尤其在国内这方面研究还很少，今后值得进一步深入研究。

苏苹 周碧辉 赵凤玉
（中国科学院生物物理研究所）